

University of Groningen

Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*

Peijnenburg, Adrianus Antonius Cornelis Maria

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1988

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Peijnenburg, A. A. C. M. (1988). Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Plasmiden zijn ringvormige DNA moleculen, die veelvuldig in prokaryote organismen worden aangetroffen. Gewoonlijk repliceren plasmiden onafhankelijk van het chromosoom van de cel waarin ze zich bevinden. Natuurlijke plasmiden blijken in de meeste gevallen niet essentieel te zijn voor de cel. Aangezien de meeste plasmiden in meerdere kopieën per cel aanwezig zijn, worden ze veel gebruikt in de moleculaire klonering voor het vermeerderen van bepaalde segmenten DNA, of van genen die interessante eiwitten specificeren.

Plasmiden die gebruikt worden voor zulke recombinant-DNA technieken in de Gram-positieve bacterie *Bacillus subtilis* blijken dikwijls slecht te worden gehandhaafd, dat wil zeggen, ze zijn segregationeel instabiel. Vaak zijn zulke plasmiden tevens structureel instabiel. **Structurele plasmide instabiliteit** betekent dat de nucleotidensequenties van het DNA worden gehegroepeerd. Met name deletievorming, het verdwijnen van segmenten DNA, treedt veelvuldig op. Dit vormt een aanzienlijke belemmering voor de ontwikkeling van efficiënte kloneringssystemen in dit organisme. Aangezien *B. subtilis*, en bacilli in het algemeen, belangrijke toepassingen vinden in de biotechnologie, is dit probleem niet alleen van wetenschappelijk, maar tevens van toegepast belang.

De rode draad die door dit proefschrift loopt, is structurele plasmide instabiliteit in *B. subtilis*. Twee aspecten van plasmide instabiliteit werden onderzocht. De eerste betrof het identificeren van cellulaire functies die betrokken zijn bij deletievorming in plasmiden. Daartoe werden deletiefrequenties vergeleken in een aantal *B. subtilis* mutanten die gestoord zijn in homologe recombinatie en/of DNA schadeherstel. Het tweede aspect betrof het verwerven van inzicht in mechanismen die ten grondslag liggen aan de vorming van plasmide deleties. Daartoe werd een groot aantal deleties op moleculair nivo geanalyseerd.

In Hoofdstuk I wordt een algemene inleiding gegeven over het optreden en het belang van structurele genoom instabiliteit met de nadruk op de vorming van plasmide deleties, het hoofdthema van dit proefschrift.

In Hoofdstuk II wordt een systeem beschreven met behulp waarvan structurele plasmide instabiliteit in *B. subtilis* kan worden gedetecteerd en geanalyseerd. Het is gebaseerd op plasmide pGP1, dat een fusie bevat tussen het penicillinase gen (*penP*) van *Bacillus licheniformis* en het β -galactosidase gen (*lacZ*) van *Escherichia coli*. De expressie van *lacZ*, die gereguleerd wordt door transcriptie/translatie signalen van *penP*, kan eenvoudig waargenomen worden met behulp van de indicator X-gal.

Dit kleurloze substraat wordt door β -galactosidase omgezet in een blauw neerslag. Plasmiden uit cellen die witte kolonies produceerden op X-gal-bevattende agar, bleken alle gedeleteerde pGP1 varianten te bevatten. De effecten van verschillende cellulaire functies op structurele plasmide instabiliteit in *B. subtilis* werden bestudeerd door de deletiefrequenties in wild-type en recombinatie- en herstel-deficiente stammen met elkaar te vergelijken. Dit onderzoek toonde aan dat de mate van deletievorming sterk beïnvloed wordt door het genotype van de gastheer. Drie klassen konden worden onderscheiden: (1), mutanten waarin pGP1 zeer stabiel was (*recE4*, *recF33*, *recL16*, *recM13*); stammen waarin pGP1 matig stabiel was (wild-type, *recD41*, *recD43*, *rec-84*); mutanten waarin pGP1 zeer instabiel was (*recA1*, *recA73*, *recB2*, *recB3*, *recG39*, *recG40*, *recH342*, *addA5*, *addB71*, *addB72*, *uvr*).

In Hoofdstuk III wordt op een opmerkelijke eigenschap van pGP1 nader ingegaan. Hoewel de *penP* en *lacZ* translationele leesframes niet op elkaar aansluiten, produceerde pGP1 toch een actief β -galactosidase eiwit met ongeveer hetzelfde molecuulgewicht als het wild-type eiwit. De synthese van dit eiwit was afhankelijk van translatie van het *penP* deel van de fusie. Het fusiepunt tussen *penP* en *lacZ* bleek de sequentie A-U-A-G te bevatten, waarbij het U-A-G stopcodon in het *penP* leesframe bleek te passen en het A-U-A codon in het *lacZ* leesframe. Uit N-terminale aminozuursequentie analyse van het door pGP1 gespecificeerde β -galactosidase eiwit bleek dat herstart van translatie plaatsvindt op dit A-U-A codon. Deze resultaten tonen aan dat expressie van *lacZ* op pGP1 het gevolg was van translationele koppeling, een verschijnsel waarbij translatie van een stroomafwaarts gelegen coderende sequentie afhankelijk is van beeindiging van translatie van een direct stroomopwaarts daarvan gelegen coderende sequentie.

Hoofdstuk IV behandelt pGP1 varianten met deleties in het *penP-lacZ* gebied zoals die gevormd worden in de wild-type stam. Uit restrictieanalyse van 60 gedeleteerde plasmiden bleek dat vrijwel alle de promotor en/of Shine-Dalgarno sequenties van *penP* verloren hadden. De rechter deletie eindpunten waren gelegen in, of stroomafwaarts van het *lacZ* deel van de fusie. Om na te gaan of specifieke sequentiepatronen aanwezig waren in de omgeving van de deletie eindpunten, werden de nucleotidenvolgorde op de fusiepunten van 28 willekeurig gekozen deleties bepaald. Slechts in één geval konden de eindpunten worden gelokaliseerd in korte homologe sequenties ("direct repeats"; 10 basenparen in dit geval) die geflankeerd waren door "inverted repeats" (12 basenparen, waarvan 1 ongepaard). De lage frequentie van deleties tussen "direct repeats" was verrassend, omdat dit type in andere systemen, zowel in *B. subtilis* als in *E. coli*, heel frequent voorkomt. Onderzoek door anderen suggereert dat dit type deleties het resultaat is van foutieve replicatie. De eindpunten van de overige 27 deleties waren niet geassocieerd met "repeats" van meer dan 3 basenpa-

ren. In de nabijheid van 15 linker eindpunten was het tetranucleotide 5'-T-G-T-A-3' aanwezig. Bovendien werd in 15 gevallen op het linker breekpunt de sequentie 5'-T-T-T-3', of de complementaire sequentie 5'-A-A-A-3' aangetroffen. De meeste linker deletie eindpunten waren gelokaliseerd in het *penP* transcriptie/translatie regulatorisch gebied, dat een sterke tweezijdige symmetrie vertoont waardoor dit gebied stabiele secundaire structuren kan vormen. Verondersteld wordt dat deze potentiële "stem-loop" structuren, samen met de bovengenoemde voorkeurssequenties, de deletie eindpunten specificeren. De verwachting is dat deze eindpunten herkenningsplaatsen voor een type-I topoisomerase zijn. Bovendien laten de resultaten de speculatie toe dat actieve transcriptie de vorming van secundaire structuren voor deletievorming zou kunnen verhogen. In de directe omgeving van de rechter deletie eindpunten werd in 15 gevallen de sequentie 5'-G/C-G/C-G/C-G-A/T-A/T-A/T-A/G gevonden. Het is onduidelijk of deze gedegenererde "consensus" een rol speelt in deletievorming.

De Hoofdstukken V and VI beschrijven deletievorming in pGP1 in, respectievelijk, de *recE4* (pGP4 plasmiden) en *addB72* mutant (pGP7 plasmiden). In de *recE4* mutant is de hoeveelheid RecE eiwit sterk gereduceerd. In de *addB72* mutant ontbreken de ATP-afhankelijke DNase en helicase activiteiten van het AddAB eiwitcomplex. Restrictieanalyse van 25 pGP4 en 28 pGP7 plasmiden liet zien dat, evenals in het wild-type, vrijwel alle linker deletie eindpunten gelokaliseerd waren in het *penP* regulatorische gebied. Analooq aan de situatie in het wild-type, bevond zich het merendeel van de rechter deletie eindpunten van zowel de pGP4 als pGP7 plasmiden in, of stroomafwaarts van *lacZ*. Van 10 pGP4- en 13 pGP7 plasmiden werden de nucleotidenvolgorde op de deletie fusiepunten bepaald. De resultaten kunnen als volgt samengevat worden: (1), deleties tussen "direct repeats" (> 3 basenparen) werden in de *recE4* mutant niet gevonden, maar in de *addB72* mutant bleek ongeveer de helft van de deleties van dit type te zijn; (2), evenals in het wild-type, waren in beide mutanten de sequenties 5'-T-T-T-3', of 5'-A-A-A-3', veelvuldig op de linker breekpunten aanwezig. Evenzo werd het 5'-T-G-T-A-3' motief frequent waargenomen in de onmiddellijke nabijheid van de linker eindpunten van deleties gevormd in de *recE4* en *addB72* mutanten; (3), gedegenererde sequentiepatronen, zoals gevonden in het wild-type, werden ook waargenomen in de omgeving van de rechter eindpunten van pGP4- en pGP7 plasmiden. De betekenis van deze patronen voor deletievorming is onduidelijk.

De linker eindpunten van pGP1 deletievarianten, ontstaan in de *recE4*- en *addB72* mutanten, bleken veelvuldig in dezelfde "stem-loop" structuren voor te komen als waarin in het wild-type deze eindpunten worden gevonden. Deze waarneming en de resultaten die hierboven zijn samengevat, suggereren dat, ondanks de grote verschil-

len in deletiefrequenties van pGP1 in de wild-type-, *recE4*-en *addB72* stammen, in alle drie achtergronden dezelfde mechanismen ten grondslag liggen aan deletievorming. De veronderstelling is dat het RecE eiwit en het AddAB complex op een indirecte manier betrokken zijn bij deletievorming. De ATP-afhankelijke helicase activiteit van het AddAB complex zou kunnen interfereren met de vorming van secundaire structuren en aldus de verhoogde deletiefrequenties in de *addB72* mutant kunnen verklaren. De hogere deletiefrequenties in het wild-type ten opzichte van de *recE4* mutant zou verklaard kunnen worden met een stimulerende rol van het RecE eiwit bij de vorming van dezelfde secundaire structuren.

Hoofdstuk VII beschrijft experimenten over vragen die in de voorgaande hoofdstukken zijn opgeroepen. De eerste betreft het effect van gastheer functies op het ontstaan van deleties tussen korte "direct repeats". Hiertoe werd "precise excision" van transposons als modelsysteem gebruikt. De frequentie van "precise excision" bleek niet te verschillen in de wild-type-, *recE4*- en *addB72* stammen. Dit resultaat is duidelijk anders dan dat met betrekking tot deletievorming tussen "direct repeats" in de *penP-lacZ* fusie van pGP1, waarbij de *addB72* mutatie een stimulerend effect bleek te hebben. Hieruit blijkt dat aan de vorming van de laatstgenoemde deleties en die op "direct repeats" ten gevolge van "precise excision" van transposons verschillende mechanismen ten grondslag liggen. Hoewel uit werk van anderen bekend is dat "precise excision" het meest efficiënt verloopt met plasmiden die via enkelstrengs rolling-circle intermediären repliceren, is dit mogelijkwerwijs niet het geval voor de in dit proefschrift beschreven deleties in pGP1.

De tweede serie experimenten had tot doel de bovenstaande veronderstelling te toetsen. Daartoe werden de replicatiefuncties van pGP1 vervangen door die van pAM β en pTB19. Laatstgenoemde plasmiden repliceren niet via een rolling-circle mechanisme en produceren geen waarneembare hoeveelheden enkelstrengs replicatie intermediären. In de van pAM β en pTB19 afgeleide plasmiden bleek de deletiefrequentie in het *penP-lacZ* gebied nog steeds hoog te zijn. Dit betekent dat enkelstrengs replicatie intermediären de vorming van de deleties beschreven in dit proefschrift niet bevorderen.